

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗМЕРНЫХ ПРИЗНАКОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ НИЗШИХ ТРИПАНОЗОМАТИД

© С. А. Подлипаев, А. Л. Лобанов

Проведен анализ десяти основных размерных характеристик клеток низших трипанозоматид из насекомых и растений, собранных в 16 географических пунктах. Только расстояние между передним концом тела и кинетопластом и кинетопластный индекс могут использоваться для дифференциации видов и популяций этих жгутиконосцев. Это позволяет применять названные характеристики для сравнения описаний и идентификации видов в тех случаях, когда другие признаки для сравнения недоступны, в том числе и при сравнении старых описаний с современными, что важно для решения многих таксономических проблем. Отмечается наличие резко уклоняющихся популяций жгутиконосцев как по морфологическим, так и по некоторым другим признакам.

В последние годы возник взрыв интереса к трипанозоматидам, связанный в первую очередь с необычной организацией их генома. Трипанозоматиды становятся одним из популярнейших объектов клеточной биологии. С другой стороны, возрождаются представления о клональной структуре паразитических простейших вообще и трипанозоматид, в частности, базирующиеся уже на современных генетических данных и утверждающие неприменимость классических представлений о виде для этих организмов и, как следствие, неприменимость для них линнеевской систематики (Tibayrenc *et al.*, 1990). В связи с этим пристальное внимание привлекают любые признаки, позволяющие дифференцировать виды, изоляты или клоны трипанозоматид. Однако до сих пор строго не доказана возможность или невозможность использования для этих целей даже таких классических критериев, как морфологические и размерные признаки клетки.

Определенная парадоксальность трипанозоматид (да и в значительной степени кинетопластид вообще) заключается в том, что группа, на макросистематическом уровне характеризующаяся уникальным для живых организмов признаком — кинетопластом, не имеет надежных морфологических признаков для родов и видов.

Родовые критерии базируются на форме клетки и взаиморасположении основных клеточных органелл: ядра, жгутика, кинетопласта и наличии или отсутствии ундулирующей мембраны (Hoare, Wallace, 1966). Однако ранее уже высказывалось мнение о недостаточности этой схемы для родовой диагностики и невозможности (точнее, принципиальных трудностях) ее практического использования, а также о явном недостатке групп родового ранга, которые могут быть выделены с использованием указанных критериев (Подлипаев и др., 1990, 1991; Kolesnikov *et al.*, 1990).

В качестве видовых критериев применялись весьма разнородные признаки: морфологические, культуральные, биохимические, молекулярно-биологические (Wallace *et al.*, 1983).

Разнородность применяемых критериев привела к трудностям в сравнении описаний и к несопоставимости старых описаний (сделанных только с применением светового микроскопа и без выделения лабораторных культур) с современными.

Достаточно широкая хозяйственная специфичность низших трипанозоматид (Подлипаев, Фролов, 1987) не позволяет использовать признак общего хозяина при сравнении описаний. Форма клеток трипанозоматид чрезвычайно изменчива и непригодна для видовой, а часто и родовой диагностики (Подлипаев, 1985). Таким образом, размерные признаки клеток могли бы служить связующим звеном между старыми описаниями видов трипанозоматид, для которых отсутствуют лабораторные культуры, и современными описаниями, включающими различные признаки таких культур. Использование размерных признаков позволило бы надеяться на идентификацию старых описаний с современными находками. Невозможность такой идентификации приводит к трудноразрешимым таксономическим проблемам и вынуждает исследователей присваивать старые названия вновь найденным паразитам без достаточной уверенности в видовой идентичности сравниваемых трипанозоматид (Jankevicius e. a., 1989).

Сложилось мнение о непригодности размерных характеристик для разделения низших трипанозоматид (Wallace e. a., 1983). Однако было показано, что некоторые размерные характеристики могут с успехом применяться для различения отдельных видов или изолятов (Podlipaev e. a., 1991; Podlipaev, 1995a, 1995b).

В предлагаемой работе предпринята попытка ответить, наконец, на вопрос: могут ли, а если могут, то какие размерные признаки клетки использоваться для дифференциации различных групп низших трипанозоматид?

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе были использованы сборы трипанозоматид из насекомых и растений (см. таблицу). Из содержимого кишки насекомого или млечного сока растений приготавливались мазки, которые окрашивались по Романовскому–Гимза. На препаратах измерялось от 25 до 50 клеток.

Данные измерений накапливались в базе данных СУБД Fo × Pro 2.0. Для их статистической обработки использовались разработанные А. Л. Лобановым программы, позволяющие работать прямо с базами данных и быстро отражать в виде легко интерпретируемых диаграмм результаты важнейших процедур вариационного анализа.

В качестве основных размерных признаков были использованы: длина клетки без свободной части жгутика (*Д*); ширина клетки (*Ш*); наибольший размер ядра (*Я*); наибольший размер кинетопласта (*К*); расстояние между передним концом тела и передним краем ядра (*ПЯ*); расстояние между задним концом тела и задним краем ядра (*ЗЯ*); расстояние между передним концом тела и кинетопластом (*П–К*); расстояние между кинетопластом и ядром (*К–Я*); ядерный индекс: отношение расстояния между передним концом тела и передним краем ядра к расстоянию между задним концом тела и задним краем ядра (*П–Я/З–Я*); кинетопластный индекс: отношение расстояния между передним концом тела и кинетопластом к расстоянию между кинетопластом и ядром (*П–К/К–Я*). Так же использовались соотношения этих размерных признаков.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из всех использованных признаков только кинетопластный индекс (*КИ*) и расстояние между передним концом тела и кинетопластом пригодны для разделения низших трипанозоматид. В ряде случаев *КИ* может достаточно надежно разделять представителей как разных родов (рис. 1), так и разных видов одного рода (рис. 2).

Характеристика трипанозоматид, использованных в работе  
The characteristics of tripanosomatids used in the present study

Шифр	Название	Хозяин	Место исследования
INSECTA			
Hemiptera			
P	<i>Proteomonas inconstans</i> Podlipaev et al., 1990	<i>Calocoris sexguttatus</i> F.	Псковская обл.
L	<i>Leptomonas nabiculae</i> Podlipaev, 1985	<i>Nabacula flavomarginata</i> Sholtz.	Россия, Ленинградская обл.
T	<i>Leptomonas peterhoffi</i> Podlipaev et al., 1985	<i>Nabacula flavomarginata</i> Sholtz.	
R	<i>Leptomonas rigidus</i> Podlipaev et al., 1991	<i>Salda littoralis</i> L.	Россия, Белое море, мыс Картеш
A	<i>Blastocrithidia raabei rostrata</i> Podlipaev, 1986	<i>Coreus marginatus</i> L.	Казахстан, зап. Аксу-Джабаглы
G	<i>Blastocrithidia raabei rostrata</i> Podlipaev, 1986	<i>Coreus marginatus</i> L.	Армения, пос. Гехарт
H	<i>Blastocrithidia raabei rostrata</i> Podlipaev, 1986	<i>Coreus marginatus</i> L.	Казахстан, пос. Турбат
V	<i>Blastocrithidia raabei rostrata</i> Podlipaev, 1986	<i>Coreus marginatus</i> L.	Таджикистан, пос. Тавиль—Дора
PLANTAE			
Asclepiadaceae			
I	<i>Phytomonas</i> sp.	<i>Cynanchum acutum</i> L.	Израиль, Верхняя Галилея
K	<i>Phytomonas</i> sp.	<i>Cynanchum sibiricum</i> L.	Россия, г. Краснодар
D	<i>Phytomonas</i> sp.	<i>Cynanchum sibiricum</i> L.	Таджикистан, пос. Денау
O	<i>Phytomonas</i> sp.	<i>Cynanchum sibiricum</i> L.	Таджикистан, горы Моголтау
E	<i>Phytomonas</i> sp.	<i>Cynanchum sibiricum</i> L.	Казахстан, река Эмба
B	<i>Phytomonas</i> sp.	<i>Cynanchum sibiricum</i> L.	Казахстан, оз. Балхаш
M	<i>Phytomonas</i> sp.	<i>Cynanchum sibiricum</i> L.	Туркмения, пос. Гермаб
Z	<i>Phytomonas</i> sp.	<i>Cynanchum sibiricum</i> L.	Узбекистан, река Зеравшан

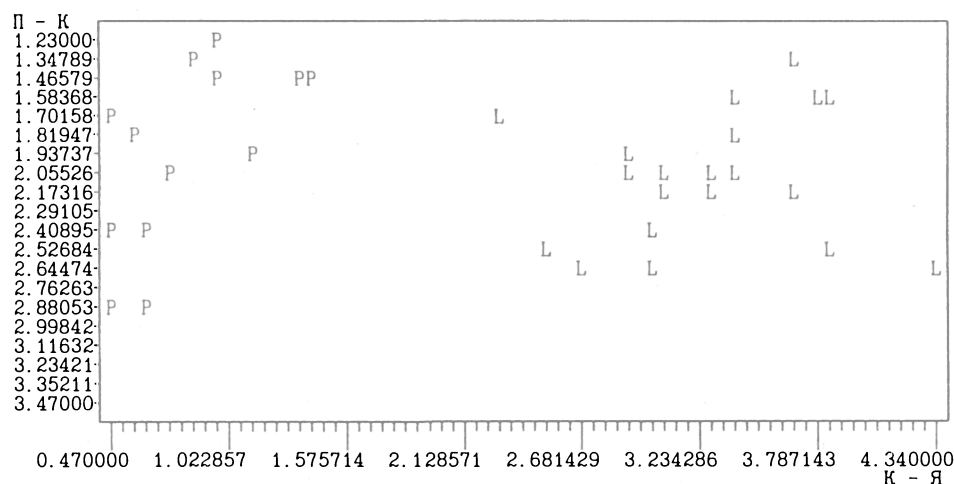


Рис. 1. Кинетопластный индекс (П-К/К-Я) для *Proteomonas inconstans* (P) и *Leptomonas nabiculae* (L).

Fig. 1. Kinetoplast index (П-К/К-Я) for *Proteomonas inconstans* (P) and *Leptomonas nabiculae* (L).

В настоящее время вопрос о видовых критериях в роде *Phytomonas* чрезвычайно запутан (Dollet, 1984), однако жгутиконосцы из растений сем. Asclepiadaceae традиционно относятся к виду *Phytomonas elmassiani* (Migone, 1916). Интересно, что все жгутиконосцы из двух видов *Cynanchum* (сем. Asclepiadaceae) очень сходны по КИ, кроме трипанозоматид из растений, собранных в Краснодаре (рис. 3). По расстоянию между передним концом тела и кинетопластом эти клетки резко отличаются ( $P < 0.01$ ) от всех исследованных нами низших трипанозоматид (рис. 4). Это позволяет предположить как таксономическую неоднородность жгутиконосцев из растений, так и обособленность трипанозоматид из *Cynanchum* Краснодара.

Биохимические и молекулярно-биологические данные свидетельствуют о гетерогенности рода *Phytomonas*, распадающегося на несколько групп, однако трипанозоматиды из растений сем. Asclepiadaceae являются достаточно гомогенной

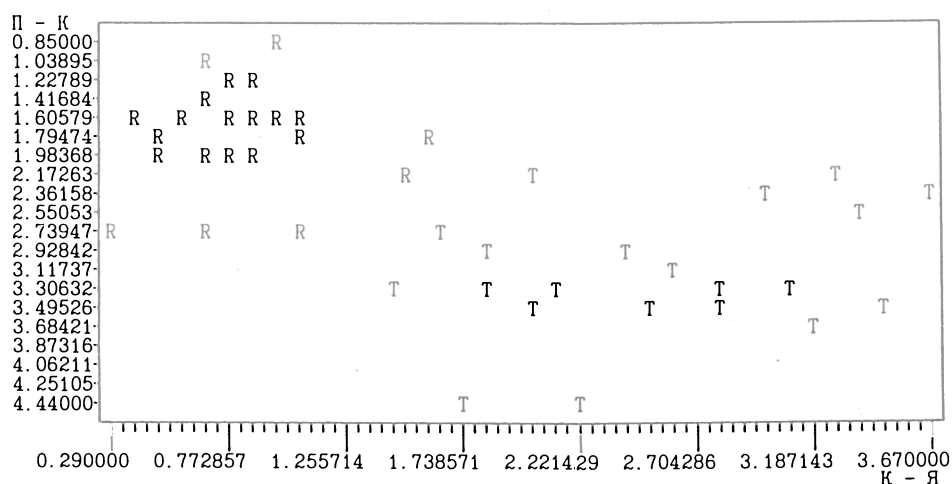


Рис. 2. Кинетопластный индекс (П-К/К-Я) для *Leptomonas rigidus* (R) и *Leptomonas peterhoffi* (T).

Fig. 2. Kinetoplast index (П-К/К-Я) for *Leptomonas rigidus* (R) and *Leptomonas peterhoffi* (T).

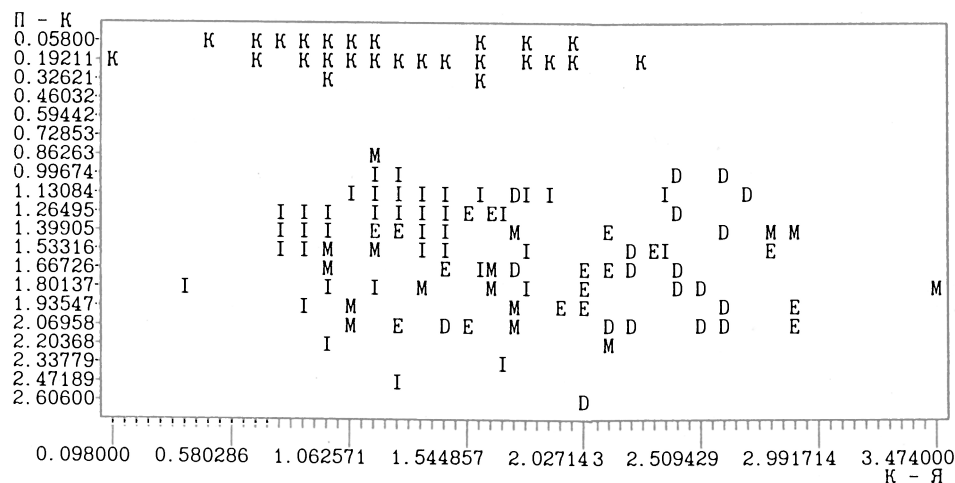


Рис. 3. Кинетопластный индекс ( $\Pi-K/K-Я$ ) для *Phytomonas* sp. из растений *Cynanchum sibiricum* L. (*D, E, K, M*) и *Cynanchum acutum* L. (*I*).

*D* – Таджикистан, пос. Денау; *E* – Казахстан, р. Эмба; *I* – Израиль, Верхняя Галилея; *K* – Россия, г. Краснодар; *M* – Туркмения, пос. Гермаб.

Fig. 3. Kinetoplast index ( $\Pi-K/K-Я$ ) for *Phytomonas* sp. from *Cynanchum sibiricum* L. plants (*D, E, K, M*) and *Cynanchum acutum* L. (*I*).

группой (Muller e. a., 1994). Приводимые в настоящем сообщении данные о резком отличии трипанозоматид из *Cynanchum*, собранных в Краснодаре, от других *Phytomonas* позволяют предположить гетерогенность жгутиконосцев, паразитирующих в растениях из сем. Asclepiadaceae и делают сомнительной практику идентификации вида по семейству растений хозяев.

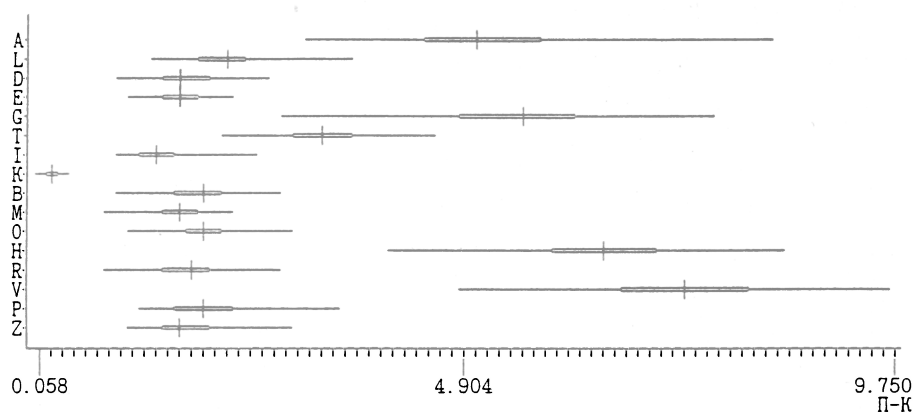


Рис. 4. Расстояние между передним концом тела и кинетопластом ( $\Pi-K$ ).

*Blastocrithidia raabei rostrata*: *A* – Казахстан, зап. Аксу-Джабаглы; *G* – Армения, пос. Гехарт; *H* – Казахстан, пос. Турбат; *V* – Таджикистан, пос. Тавиль-Дора; *Leptomonas nabiculae*: *L* – Россия, Ленинградская обл.; *Phytomonas* sp.: *B* – Казахстан, оз. Балхаш; *D* – Таджикистан, пос. Денау; *E* – Казахстан, р. Эмба; *I* – Израиль, Верхняя Галилея; *K* – Россия, Краснодар; *M* – Туркмения, пос. Гермаб; *O* – Таджикистан, горы Моголтау; *Z* – Узбекистан, Зеравшан; *Leptomonas peterhoffi*: *T* – Россия, Ленинградская обл.; *Leptomonas rigidus*: *R* – Россия, Белое море; *P* – *Proteomonas inconstans*: Россия, Псковская обл.; одна линия – размах изменчивости; двойная линия – доверительный интервал; вертикальная линия – среднее.

Fig. 4. The distance between the anterior end of the body and the kinetoplast ( $\Pi-K$ ).

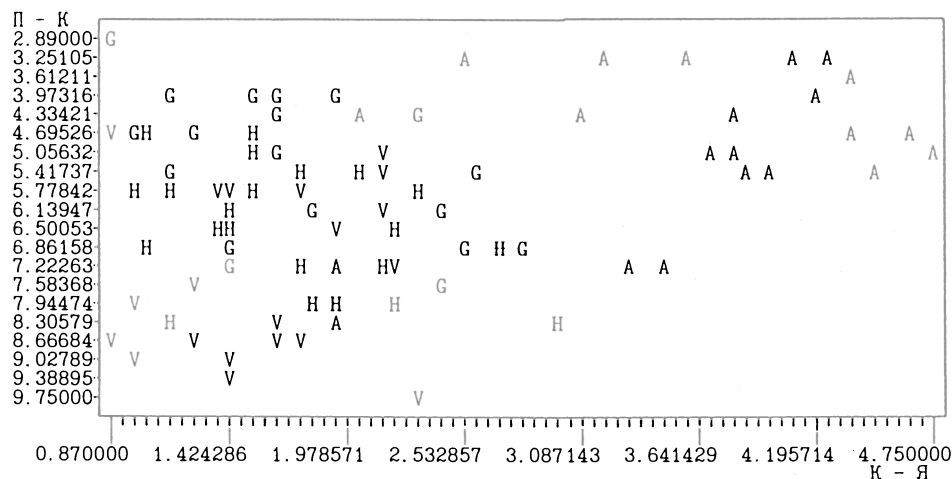


Рис. 5. Кинетопластный индекс (П-К/К-Я) для *Blastocrithidia raabei rostrata*.

А — Казахстан, зап. Аксу-Джабаглы; G — Армения, пос. Гехарт; H — Казахстан, пос. Турбат; V — Таджикистан, пос. Тавиль-Дора.

Fig. 5. Kinetoplast index (П-К/К-Я) for *Blastocrithidia raabei rostrata*.

Сходная с *Phytomonas* ситуация имеет место и при зараженности клопа *Coreus marginatus* (сем. Coreidae) трипанозоматидой *Blastocrithidia raabei rostrata* (Подлипаев, 1988). Жгутиконосцы из одного местообитания (Аксу-Джабаглинский заповедник, Казахстан) отличаются ( $P < 0.01$ ) от всех остальных по КИ (рис. 5), в то время как трипанозоматиды из других мест неразличимы по этому критерию.

Длина клетки трипанозоматид чрезвычайно изменчива и всегда справедливо считалась непригодной для диагностики. В связи с этим достаточно неожиданным оказалось, что клетки *Proteomonas inconstans* значительно короче клеток остальных исследованных в настоящей работе трипанозоматид (рис. 6).

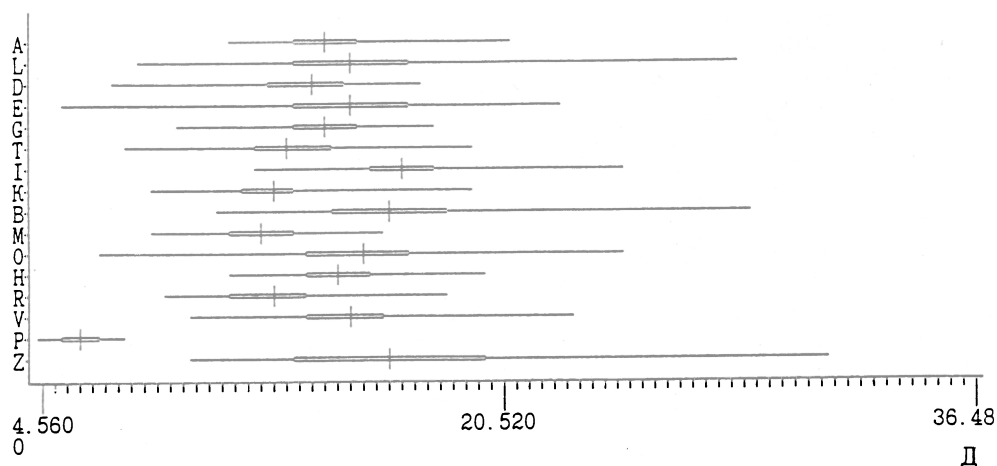


Рис. 6. Длина клеток.

Условные обозначения см. табл. 1 и рис. 4.

Fig. 6. Body length of flagellates.

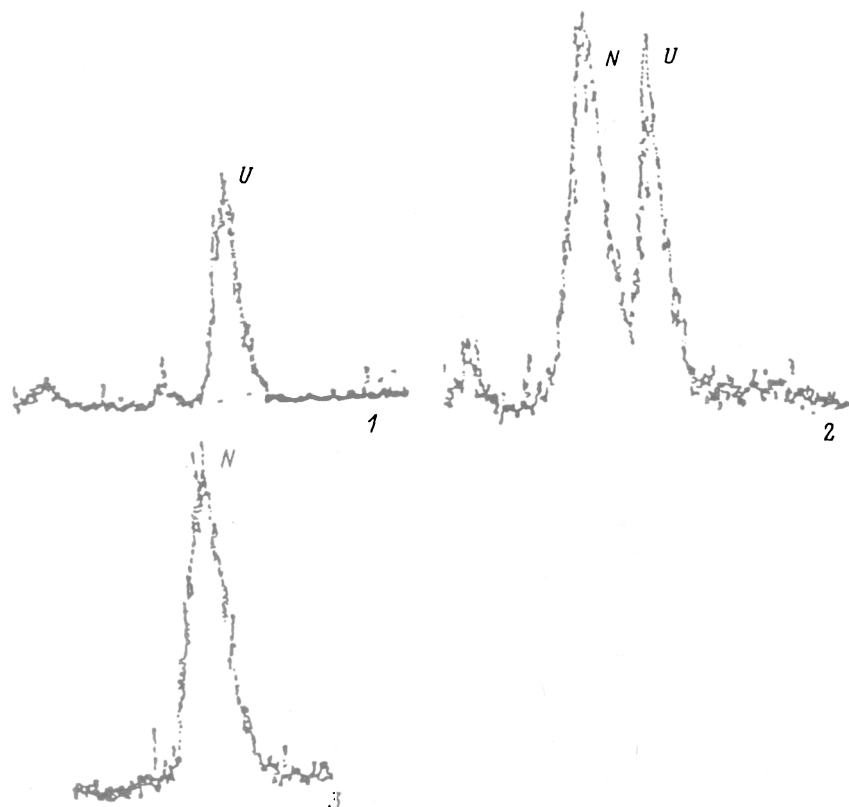


Рис. 7. Распределение клеток *Crithidia guilhermei* (U) и *C. roitmani* (N) по количеству ДНК.  
По оси абсцисс — содержание ДНК в условных единицах; по оси ординат — количество клеток с данным содержанием ДНК; 1 — культура клеток *Crithidia guilhermei*; 2 — смесь культур *Crithidia guilhermei* (U) и *C. roitmani* (N); 3 — культура клеток *C. roitmani*.

Fig. 7. The spread of the cells of *Crithidia guilhermei* (U) and *C. roitmani* (N) according to DNA content.

Особенно интересно, что отчетливо прослеживается тенденция к наличию резко уклоняющихся по морфологическим признакам популяций жгутиконосцев: *Phytomonas* из Краснодара по сравнению с другими исследованными трипанозоматидами, в том числе и фитофлагеллятами; *Blastocrithidia raabei rostrata* из Аксуджабаглы по сравнению с представителями этого же вида из других мест; *Proteomonas inconstans* по сравнению с другими использованными в настоящей работе трипанозоматидами.

Прослеживаемая тенденция не ограничивается только морфологическими признаками, так ранее с использованием проточной цитофлуориметрии было показано что количество ядерной ДНК у исследованных культур низших трипанозоматид, принадлежащих к разным родам, видам, изолятам и клонам, практически одинаково (Подлипаев и др., 1991). Однако дальнейшие исследования выявили одну культуру *Crithidia roitmani* (получена от проф. Е. Samargo, Университет Сан-Пауло, Бразилия), в которой содержание ДНК в клетках значительно меньше, чем в остальных более чем двух десятках исследованных изолятах (например, в *C. guilhermei*; рис. 7). Удовлетворительного объяснения этому факту мы пока не имеем, можно лишь констатировать, что наличие резких отклонений характерно не только для морфологических признаков, но и затрагивает другие

характеристики клетки. Наличие таких флуктуаций признаков, вероятно, представляет характерную черту эволюции трипанозоматид и, очевидно, находится в связи с необычной организацией весьма лабильной генетической системы этих простейших (генетический контроль системы поверхностных гликопротеидов, наличие сети плазмидоподобных миниколец кинетопластной ДНК и др.).

В ряде случаев самостоятельность группы, выделенной на основе морфологических признаков, подтверждается при применении и других независимых критериев. Так, *Leptomonas rigidus* хорошо отличается от других *Leptomonas*, паразитирующих в клопах, по размерным признакам (рис. 2; Podlipaev e. a., 1991); по форме колоний на твердых питательных средах; по размеру мини- и максиколец кинетопластной ДНК и по рестрикционной картине максиколец кинетопластной ДНК (Подлипаев, 1985; Kolesnikov e. a., 1990; Podlipaev e. a., 1991). Таким образом, имеется соответствие результатов, достигнутых как при применении морфологических критериев, так и полученных другими способами, что делает применение некоторых размерных признаков для дифференциации низших трипанозоматид возможным и оправданным.

Из всех использованных размерных характеристик клеток низших трипанозоматид только расстояние между передним концом тела и кинетопластом и кинетопластный индекс могут использоваться для дифференциации видов и популяций этих жгутиконосцев. Это позволит применять названные характеристики для сравнения описаний и идентификации видов в тех случаях, когда другие признаки для сравнения недоступны.

Настоящая работа поддержана Международным научным фондом (International Scientific Foundation) и Российским правительством (гранты R6R000 и R6R300), а также Российским фондом фундаментальных исследований.

#### Список литературы

- Подлипаев С. А. Новые виды низших трипанозоматид из полужесткокрылых (Heteroptera) семейств Gerridae и Nabidae: стадии их жизненных циклов в природе и при культивировании в лаборатории // Тр. ЗИН АН СССР. 1985. Т. 129. С. 35–47.
- Подлипаев С. А. *Blastocrithidia raabei* rostrata subsp. n. (Mastigophora, Trypanosomamonadida) — паразит клопа *Coreus marginatus* // Зоол. журн. 1988. Т. 67, вып. 9. С. 1407–1411.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О. Описание и лабораторное культивирование *Blastocrithidia miridarum* sp. n. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) // Паразитология. 1987. Т. 21, вып. 4. С. 545–552.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О., Колесников А. А. *Proteomonas inconstans* nov. gen., nov. sp. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) — паразит клопа *Calocoris sexguttatus* (Hemiptera, Miridae) // Паразитология. 1990. Т. 24, вып. 4. С. 339–346.
- Подлипаев С. А., Филатов М. В., Пантина Р. А. Сравнительное определение содержания ДНК у низших трипанозоматид из клопов Северо-Запада СССР // Паразитология. 1991. Т. 25, вып. 3. С. 250–257.
- Dollet M. Plant diseases caused by flagellate protozoa (Phytomonas) // Ann. Rev. Phytopathol. 1984. Vol. 22. P. 115–132.
- Hoare C. A., Wallace F. G. Development stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology // Nature, London. 1996. Vol. 212. P. 1385–1386.
- Jankevicius J. V., Jankevicius S. I., Campaner M., Conchon I., Maeda L., Teixeira M. M. G., Freymuller E., Camargo E. P. Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes // J. Protozool. 1989. Vol. 36, N 3. P. 265–271.
- Kolesnikov A. A., Maslov D. A., Podlipaev S. A. Comparative restriction enzyme cleavage analysis of kinetoplast DNA from the lower trypanosomatids isolated in the North-West region of the USSR // Arch. Protistenkd. 1990. Bd 138. S. 239–250.
- Migone L. E. Un nouveau flagelle des plantes, *Leptomonas elmassiani* // Bull. Soc. Pathol. Exot. 1916. T. 9. P. 356–359.



- Muller E., Gargani D., Shaeffer V., Stevens J., Fernanders-Beserra C., Sanchez-Moreno M., Dollet M. Variability in the phloem restricted plant trypanosomes (*Phytomonas* spp) associated with wilts of cultivated crops // *European J. Plant Pathology*. 1994. Vol. 100. P. 425-434.
- Podlipaev S. A. Plant trypanosomatids in the Former Soviet Union. III *Phytomonas* Workchop. Montpellier, France. 1995a. Abstracts, P. 7.
- Podlipaev S. A. Plant trypanosome (*Mastigophora*: *Trypanosomatidae*) from *Cynanchum acutum* L. (*Asclepiadaceae*) plants in Nothern Israel // *Phytoparasitica*. 1995b. Vol. 24, N 4.
- Podlipaev S. A., Malysheva M. N., Kolesnikov A. A. *Leptomonas rigidus* sp. n. (*Trypanosomatidae*) – a parasite of *Salda littoralis* L. (*Hemiptera*: *Heteroptera*) // *Acta Protozool.* 1991. Vol. 30. P. 121-127.
- Tibayrenc M., Kjellberg F., Ayala F. J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. Vol. 87. P. 2414-2418.
- Wallace F. G., Camargo E. P., McGhee E. P., Roitman I. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids // *J. Protozool.* 1983. Vol. 30. P. 308-313.

ЗИН РАН, Санкт-Петербург, 199034

Поступила 8.11.1995

#### THE EMPLOYING OF MEASURE CHARACTERS FOR A DISCRIMINATION OF LOWER TRYPANOSOMATIDS

S. A. Podlipaev, A. L. Lobanov

**Key words** : *Trypanosomatidae*, size characters, species, population, taxonomy.

#### SUMMARY

The analysis of 10 main size characters of the cells was carried out in the lower trypanosomatids that were isolated from the insects and plants in 16 various geographical points. Only two of them – the distance between the anterior end of the body and the kinetoplast and the kinetoplast index may be employed for the discrimination of the species and populations of these flagellates. It allows to apply these characters when it is necessary to compare descriptions and to identify species in the cases when other characters are inaccessible for comparison, p. e. when compare the old descriptions with contemporary ones in order to solve some taxonomic problems. There was pointed the existance of the flagellates populations that differ considerably from the others by their morphological and some other characters.